การชักนำรากต้นกล้ามะละกอ โดยการถ่ายยีน *rol*C – Inverted Repeat CP และการทดสอบความต้านทานต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน

Root Induction of Papaya Seedling *via* Gene Transferof*rol*C – Inverted Repeat CP and Resistant Investigation against *Papaya ringspot virus*

ธนภัทร พันธ์สวัสดิ์[1] อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์[1] และ ศรีเมฆ ชาวโพงพาง[1, 2*]

Thanapat Phansawat[1] Ampaiwan Paradornnuwat[1] and Srimek Chowpongpang[1, 2*]

Abstract

Plasmid **c**onstruction of *rol*Cgene from *Agrobacterium tumefaciens*Ri plasmid and inverted-repeat CP cassettes into pCAMBIA2300 namely p2313*rol*C. The plasmid was transferred into *A. tumefaciens*AGL-1 for genetic transformation by co-cultivation with stem cut papaya seedlings from different ages. New induced roots of papayawere obtained at 16, 14, and 0 from 3, 2, and 1 month old, respectively.Only 2 and 3 month old of papaya seedlings were be able to induce roots. Subsequently *rol*C and CP genes were investigated by PCR methods and found both genes inserted into DNAof the root tissue. Rooted papaya plants werethen challenged for resistance against *Papyaringspot virus* by manual inoculation. The mosaic symptoms on leaves were visible within 7-10 day after inoculation from both control and treatment experiments. However, there was a recovery from transformed rooted-papaya that new emerged 5-6 leaves from the inoculated leafdid not show any symptoms indicating a sign of resistance might induce RNA silencing from inverted-repeat CP. Detection of virus by RT-PCR technique from recovery leaves were positive for CP gene comparing to positive control from infected papaya of non-root induced papaya. Presumably, there still virus titer in recovery leaves but in low level.

Keywords : inverted-repeat CP, *rol*C, PRSV resistance, rootinduction

[1] ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพ 10900

Department of Plant Pathology, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkhen campus, Bangkok 10900, Thailand

[2] ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสนจ.นครปฐม 73140

Center for Agricultural Biotechnology (CAB) Kasetsart University, KamphaengSaen, NakhonPathom, 73140, Thailand

รับเรื่อง : พฤษภาคม 2556

* Corresponding author : agrsmc@ku.ac.th

บทคัดย่อ

การสร้างพลาสมิดที่มีชุดยีน *rol*C จาก Ri พลาสมิดของเชื้อ *Agrobacterium tumefaciens* และชุดยีน CP แบบ inverted repeat จากอนุพันธ์พลาสมิด pCAMBIA 2300 ให้ชื่อว่า p2313*rol*C และถ่ายโอนเข้าเชื้อ *A. tumefaciens* สายพันธุ์ AGL-1 เพื่อใช้ในการถ่ายยีน โดยการตัดลำต้นกล้ามะละกอที่มีช่วงอายุแตกต่าง จากนั้นจุ่มรอยตัดกับเชื้อพาหะเพื่อใช้เกิดการถ่ายทอดยีนดังกล่าว ภายหลังการทดลองพบว่าลำต้นมะละกอเกิดรากใหม่ได้จำนวน 16 , 14 และ 0 จากต้นกล้ามะละกออายุ 3 2 และ 1 เดือนตามลำดับโดยพบว่าลำต้นที่มีอายุ 2 และ 3 เดือนสามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ หลังจากนั้นนำรากที่เกิดขึ้นไปตรวจสอบหายีน *rol*C และ CP ด้วยเทคนิค PCR ซึ่งพบยีนทั้งสองยีนสอดแทรกอยู่ในรากทุกต้น ต้นมะละกอที่ได้รับการถ่ายยีนในรากที่ถูกชักนำ นำไปทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ โดยปลูกถ่ายเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวน อาการใบด่างเกิดขึ้นในช่วงเวลา 7-10 วันหลังจากปลูกเชื้อทั้งในต้นที่ถ่ายยีนโดยการชักนำรากและต้นปกติและพบว่าใบใหม่ที่ 5-6 นับจากใบที่ปลูกเชื้อไม่มีอาการของโรคใบด่าง ในต้นที่ชักนำให้เกิดรากแสดงให้เห็นถึงความทนทานต่อโรคใบด่างจุดวงแหวนได้โดยซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองเปรียบเทียบที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนยังคงแสดงอาการของโรคชัดเจน บ่งชี้ว่า inverted-repeat CP ที่ถ่ายเข้าไปที่รากสามารถชักนำให้เกิด RNA silencing ทำให้อาการของโรคหายไปตรวจสอบหาเชื้อไวรัสด้วยเทคนิค RT-PCR จากใบที่ไม่แสดงอาการและสามารถพบยีน CP ของเชื้อ PRSV ทั้งในต้นที่ได้รับการถ่ายยีนและต้นชุดการทดลองควบคุมอนุมานว่ายังมีไวรัสในระดับต่ำ

คำนำ

มะละกอเป็นพืชเศรษฐกิจที่ให้ผลผลิตเร็ว โดยมะละกอสามารถปลูกได้ในทุกพื้นที่ของประเทศไทย แต่ปัจจุบันพื้นที่การเพาะปลูกมะละกอ มีแนวโน้มลดน้อยลงอย่างมาก เป็นเพราะเกษตรกรไม่สามารถเพาะปลูกมะละกอได้ เนื่องมาจากการระบาดของโรคไวรัสใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอ จึงเป็นอุปสรรคสำคัญต่อการผลิตมะละกออย่างต่อเนื่องตลอดมา ไวรัสนี้มีเพลี้ยอ่อนเป็นแมลงพาหะที่ถ่ายทอดเชื้อไวรัสแบบ non-persistentทำให้สามารถแพร่กระจายโรคได้อย่างรวดเร็วรวมทั้งโรคนี้มีพืชอาศัยหลายชนิด ทั้งพืชตระกูลแตงและวัชพืชที่เป็นแหล่งสะสมของโรค ทำให้โรคเกิดการระบาดในพื้นที่ที่มีการเพาะปลูกซ้ำเป็นบริเวณกว้าง(Wasee, 1999)ในอดีตการป้องกันโรคใบด่างจุดวงแหวนในมะละกอจะเน้นการกำจัดเพลี้ยอ่อนที่นำโรคมายังมะละกอ แต่ก็ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เพราะเพลี้ยอ่อนไม่ได้อาศัยอยู่บนต้นมะละกอตลอดเวลา และเพลี้ยอ่อนใช้เวลาดูดกินไม่นานก็สามารถถ่ายทอดไวรัสใบด่างจุดวงแหวนได้ ส่วนวิธีการทำลายต้นที่เป็นโรคเป็นวิธีที่ได้ผลดี แต่ยังเกิดความเสียหายส่วนวิธีการหาพันธุ์ต้านทานโรคในธรรมชาติ หรือปรับปรุงพันธุ์ต้านทานโดยวิธีผสมเกสรเป็นวิธีที่ปฏิบัติได้แต่ยังไม่สามารถผลิตพันธุ์ที่ต้านทานโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอได้ นอกจากการใช้พืชดัดแปรพันธุกรรม (Warin et al., 2003) จากปัญหาการเข้าทำลายของโรคดังกล่าวที่ยังไม่สามารถแก้ไขได้อย่างมีประสิทธิภาพ การประยุกต์เทคนิค RNA interference หรือ RNAi จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง ที่จะนำมาใช้ในการพัฒนามะละกอให้ทนทานต่อการเข้าทำลายต่อไวรัส โดยอาศัย กระบวนการในการควบคุมการแสดงออกของลักษณะทางพันธุกรรมซึ่งพบได้ทั้งในพืชสัตว์ และมนุษย์โดยเฉพาะพืชที่ได้รับการถ่ายยีนที่มีการเรียงตัวแบบ inverted repeat ภายหลังถูกถ่ายทอดเข้าสู่เซลล์พืช จะเกิดการเข้าคู่กันของสาย RNA เกิดเป็น double strand RNA (dsRNA)เมื่อผ่านกระบวนการต่าง ๆ แล้ว จะมีผลไปทำลาย messenger RNA (mRNA) ของยีนหนึ่ง ๆ อย่างจำเพาะได้มีการทดลองผลิตต้น white clover (*Trifoliumrepens*) ต้านทานต่อโรค WCMV (*White clover mosaic virus*) โดยผ่านกระบวนการ RNA interference(Ludlow *et al*., 2009) เนื่องจาก RNA silencing ในพืชสามารถส่งสัญญาณกระจายจากเซลล์พืชที่เกิด silenced ไปสู่เซลล์ค้างเคียงได้โดยสามารถส่งผ่านได้ทั่วต้นในแต่ละส่วนของพืช ซึ่งเกิด

จาก small interference RNA (21-22nt) ผ่านทาง plasmodesmata หรือ phloem ตามรายงานของ(Hamilton *et al*., 2002)และ(Himber *et al*., 2003)ซึ่ง(Tournier *et al*., 2006)ได้รายงานการ silenced ของยีน GFP ซึ่งใช้ต้นตอยาสูบเป็นแบบ silencing ส่วนยอดใช้ต้นยาสูบที่ได้รับการถ่ายยีน GFP ให้แสดงออกตลอดเวลา ภายหลังการเสียบยอดพบยอดต้นยาสูบไม่มีการแสดงออกของยีน GFP ซึ่งเกิดจากกลไก RANi ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ใช้หลักการ post transcriptional gene silencing (PTGS)หรือ RNAi มาประยุกต์ใช้ในการผลิตต้นกล้ามะละกอให้ทนทานต่อโรคใบด่างจุดวงแหวน โดยอาศัยวิธีการชักนำรากใหม่จากลำต้นมะละกอ เพื่อใช้เป็นต้นแบบพื้นฐานในการพัฒนาต้นกล้ามะละกอต้านทานโรคนี้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1.การสร้างพลาสมิด p2313rolC เพื่อใช้ในการถ่ายยีน

ชุดพลาสมิด p2313 (Chowpongpang, 2002) เป็นเวคเตอร์ backbone จาก pCAMBIA2300 ส่วนยีน *rol*C นำมาจากชุดพลาสมิด pEXM120 (Peña *et al*., 2004)โดยใช้ไพรเมอร์ CP*rol*CXhF 5'ACTGCTCGAG CGTTTTAGGGCCCAAAAATCA3'และ CP*rol*CXhR5' GCTACTCGAGGCCTGGTTTAAACATGTCGGC3'โดยเพิ่มเติมตำแหน่ง Restriction Enzymes *Xho*I (ขีดเส้นใต้) ในส่วน 5' และ 3' ของยีนที่รวม promoter และterminator จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ของยีน *rol*Cที่ได้ไปเชื่อมต่อกับ cloning vector pCR8®/GW/TOPO และถ่ายโอนเข้า competentcells *E. coli* strain MachIโดยวิธี $CaCl_2$ transformation (Sambrook*et al*., 1989) จากนั้นนำมาคัดเลือกโคโลนีบนอาหาร 2xYT ที่มี specinomycin 100 mg/L พลาสมิดลูกผสมที่ได้หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สถาบันจีโนมศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีแห่งชาติอุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย จังหวัดปทุมธานี ด้วยเทคนิค dideoxy-chain termination โดยใช้ชุดปฏิกิริยา Bigdye® dideoxy terminator จากนั้นตัดชิ้นยีน *rol*Cจาก cloning vector ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Xho*I ไปแทนที่ตำแหน่งยีน neomycin phosphotransferase(*NPTII*) ในพลาสมิด p2313 ที่มียีน CP แบบ Inverted repeat ขนาดประมาณ 860 bp แล้วตรวจสอบโคโลนีด้วยเทคนิค PCR อีกครั้ง จากนั้นถ่ายโอนพลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *A. tumefaciens*สายพันธุ์ AGL-1 โดยวิธี electroporation

2. การเตรียมต้นกล้ามะละกอ และการถ่ายชุดยีน p2313*rol*Cเข้าสู่ลำต้นมะละกอด้วยวิธีชักนำราก

ตกตะกอนแยกเซลล์แบคทีเรีย *A. tumefaciens* ที่มีชุดพลาสมิด p2313*rol*C ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเร็ว 7000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนแบคทีเรียด้วยอาหารเหลวสูตร MS ที่เติม acetosyringone ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ แล้วทำการตกตะกอนแยกเซลล์แบคทีเรียที่ระดับอุณหภูมิเดิมอีกครั้ง เติมอาหารเหลวปรับปริมาณเชื้อให้มีความเข้มข้นระหว่างเชื้อกับอาหารเหลวอัตรา 1:10 แล้วนำไปถ่ายยีนเข้าลำต้นมะละกอ

ต้นกล้ามะละกอพันธุ์แขกดำศรีสะเกษ จากศูนย์วิจัยพืชสวนศรีสะเกษ ในช่วงอายุของต้นกล้าที่ 1 2 และ 3 เดือนตามลำดับตัดส่วนลำต้นเหนือพื้นดินแล้วนำมาแช่ในเชื้อ *Agrobateriumtumefaciens* ตามความเข้มข้นที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เชื้อแบคทีเรียเข้าไปในเซลล์พืชตรงบริเวณรอยตัดของชิ้นยอดต้นกล้ามะละกอ ในกรณีของชุดการทดลองควบคุม (control) จะใช้ยอดต้นกล้ามะละกอแช่ใน MS ที่เติม acetosyringone โดยไม่มีเชื้อแบคทีเรียเป็นเวลา 30 นาทีเช่นกัน จากนั้นทำการย้ายยอดต้นกล้ามะละกอออกมาซับแบคทีเรียด้วยกระดาษที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำมาเพาะชำในที่มืดเป็นเวลา 2-3 วัน อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ย้ายยอดต้นกล้ามะละกอไปปลูกในเพอร์ไลท์วางในที่มีแสงสว่าง ในส่วนของชุดการทดลองควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกัน จนเกิดรากใหม่และตรวจสอบยีน *rol*C ในรากมะละกอด้วยเทคนิค PCR เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุม

3. การศึกษาอายุของต้นกล้ามะละกอพันธุ์แขกดำศรีสะเกษที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนด้วยวิธีชักนำราก

การพัฒนาประสิทธิภาพของพลาสมิดในการชักนำให้เกิดรากใหม่ของต้นกล้ามะละกอโดยไม่ผ่านการเพาะต้นกล้าจากเมล็ดหรือการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ แต่ใช้วิธีการชักนำรากแบบจุ่มลำต้นมะละกอกับเชื้อแบคทีเรียแทน ซึ่งศึกษาปัจจัยเรื่องอายุที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนแบบชักนำราก โดยแบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุด แต่ละชุดการทดลองจะแตกต่างกันที่อายุของต้นกล้ามะละกอที่นำมาใช้ชักนำรากคือ 1 2 และ 3 เดือน ทดสอบการชักนำรากครั้งละ 100 ต้นต่อการทดลอง จำนวนซ้ำ 3 ครั้ง รวมทั้งชุดการทดลองควบคุมด้วย

4. การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบยีน *rolC*ในรากมะละกอด้วยเทคนิค PCR

การสกัดดีเอ็นเอจากรากมะละกอ โดยใช้รากมะละกอ0.1 กรัม บดจนละเอียด จากนั้นนำมาใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติม homogenization buffer (0.1M NaCl, 0.2 M sucrose, 50 mM EDTA, 30 mMTris-HCl, pH 8) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรที่ได้เติม ß -mercaptoethanol 1%โดยการตีด้วย stainless bead (∅4mm) ด้วยเครื่อง beater ที่ 25 Hz นาน 1 นาที และเติมlysis buffer (50 mMTris-HCl, 50 mM EDTA, 2.5% SDS, pH8) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันโดยการกลับหลอด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม precipitation buffer (5 M potassium acetate, 3 M acetic acidpH 4.8) ปริมาตร 192 ไมโครลิตรและ chloroform 200 ไมโครลิตรเขย่าให้เข้ากันโดยการกลับหลอดบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใส 700 ไมโครลิตรใส่หลอดใหม่เติม isopropanol 700 ไมโครลิตร ผสมให้สารผสมกันเบา ๆ แล้วนำไปหมุนเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70%ethanol และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย distilled water ที่ผสมเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 10ไมโครกรัมต่อ

จากนั้นเตรียมส่วนผสมเพื่อทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 10x PCR buffer (30mM Tricine pH8.4, 0.1% Thesit, 0.01% gelatin, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, dNTPs ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 2 ไมโครลิตรไพรเมอร์ CP*rol*CXhF ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ CP*rol*CXhR ความเข้มข้น 20 ไมโครโมลาร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, *Taq*DNA polymerase (Thermoscientific) (5 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, dH_2O ปริมาตร 39 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอที่สกัดได้(ประมาณ 100 นาโนกรัม) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้ 10x PCR buffer (30mM Tricine pH8.4, 0.1% Thesit, 0.01% gelatin, 2 mM $MgCl_2$, 5 mM 2-mercaptoethanol) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร, dNTPs ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 2 ไมโครลิตรโดยมีขั้นตอนดังนี้ initial PCR denaturation เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส, 3 step cycling (35 cycles) Denaturation เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส annealing เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียสextension เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสสุดท้าย final extension เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสแล้วตรวจสอบด้วยเทคนิค agarose gel electrophoresis โดยใช้ 1% agarose gel ใน 1x TAE buffer ย้อมด้วย ethidium bromide 10 มก/ล 10 นาทีและตรวจสอบแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

5. การทดสอบความต้านทานเชื้อ PRSV

หลังจากได้ต้นกล้ามะละกอจากการชักนำรากในทุกช่วงอายุของยอดต้นกล้าที่นำมาถ่ายยีน และตรวจพบยีน *rol*C มาทดสอบความต้านทานต่อโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ โดยรอจนกว่าจะเกิดใบใหม่ประมาณ 3-4 ใบ จากนั้นปลูกถ่ายเชื้อ PRSV กับต้นมะละกอที่ผ่านการถ่ายยีน (ใบมะละกอที่เป็นโรค 1 กรัม ผสมกับ 0.1โมลาร์ PBS buffer ผสมกับ Celite® (diatomateus earth) 0.1 กรัมและต้นควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ทุก ๆ 10 วัน จำนวน 3 ครั้ง แล้วตรวจลักษณะอาการของโรคภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อและตรวจสอบเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR เพื่อยืนยันผลการทดสอบความทนทานต่อโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

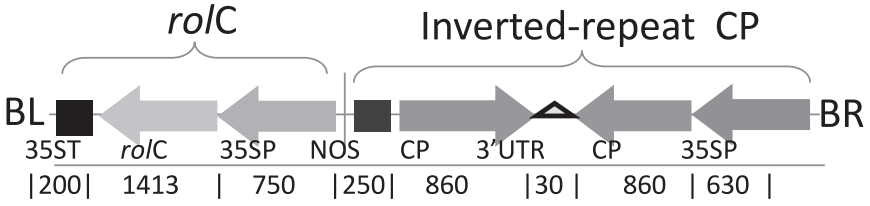
6. การตรวจสอบเชื้อ PRSV ด้วยเทคนิคRT-PCR

สกัดอาร์เอ็นเอจากใบมะละกอที่ทนทานต่อโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ โดยบดตัวอย่างใบมะละกอชุดควบคุม และชุดการทดลองที่ผ่านการถ่ายยีนประมาณ 100 มิลลิกรัมเติม Trizol® Reagent ปริมาตร 500 ไมโครลิตรบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสนาน 10 นาทีจากนั้นเติม chloroform ปริมาตร 200 ไมโครลิตรบ่มไว้ที่ 25 องศาเซลเซียสนาน 3 นาที แล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 0-15 นาทีเก็บน้ำส่วนใสด้านบนไว้ปริมาตร 400 ไมโครลิตรแล้วจึงเติม isopropanal 400 ไมโครลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25องศาเซลเซียส) นาน 10 นาทีแล้วปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาทีทิ้งส่วนใสแล้วล้างด้วย 70 % Ethanol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร 2 ครั้ง สุดท้ายละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ Rnase-free water ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเพิ่มปริมาณ cDNA ด้วยด้วยชุด RevertAidkit(Thermo scientific)โดยนำอาร์เอ็นเอที่ได้จากการสกัด มาทำปฏิกิริยา reverse transcription (RT) ในการสังเคราะห์ cDNA ในขั้นตอน RT โดยทำปฏิกิริยาใน25 ไมโครลิตร โดยใช้ total RNAs ที่สกัดได้ประมาณ 200 นาโนกรัม 3ไมโครลิตร น้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร และไพรเมอร์ (reverse)SC104 5'ATTGCGC ATACCTAGGAGAGAGTG3'(20 ไมโครโมลาร์) 1 ไมโครลิตร อุ่นที่ 65 องศาเซลเซียส 5 นาที และน้ำแข็งทันทีนาน 2 นาที และเติม 5 x RT buffer 5 ไมโครลิตร 10mMdNTPs2 ไมโครลิตร, Ribolock 1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 2ไมโครลิตร reverse transcriptase enzyme 1 ไมโครลิตร (200 unit) บ่มที่ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และตามด้วยปฏิกิริยา PCR โดยใช้ไพรเมอร์ SC5015'AAAGTGGTATGAGGGAGTGAG3' และ SC104ที่จำเพาะต่อเชื้อ PRSV โดยที่ปฏิกิริยา PCR เช่นเดียวกับการตรวจหายีน *rol*C โดยใช้cDNA 1 ไมโครลิตรเป็นต้นแบบ โดยมีขั้นตอน annealing เปลี่ยนเป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิ 58องศาเซลเซียส

ผลและวิจารณ์

1.การสร้างพลาสมิด p2313*rol*C เพื่อใช้ในการถ่ายยีน

ชุดพลาสมิด p2313*rol*C ประกอบด้วยชุดยีน 2 ชุดคือ ยีน *rol*C ที่มีขนาด ประมาณ 2,360 คู่เบส และชุดยีน CP แบบ inverted-repeat ขนาด 2,630 คู่เบส (ภาพที่ 1) จากการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยวิเคราะห์เปรียบเทียบกับยีน *rol*C ของพลาสมิด pRi1724 ที่มีรายงานแล้วใน GenBank(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) โดยใช้ตัวเลือก Blastn พบว่ามีค่าความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *rol*Cของ *Agrbacteriumrhizogenes* pRi1724 (AB0066891)ถึงร้อยละ 99 ภายหลังถ่ายทอดพลาสมิดเข้าสู่เชื้อ *Agrobacterium tumefaciens*strain AGL-1 เพื่อใช้ถ่ายยีนเข้าสู่ลำต้นมะละกอด้วยวิธีชักนำรากต่อไป



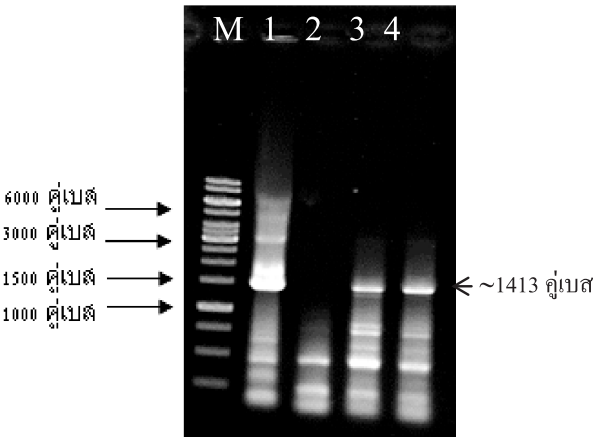
ภาพที่ 1 : แผนที่ยีนของพลาสมิด p2313*rol*C ขนาด 11,400 คู่เบส ประกอบด้วย 2ชุดยีนคือชุด*rol*Cและชุดยีน Inverted –repeat CPหมายเลขด้านล่างคือขนาดของชิ้นยีนแต่ละชิ้น (คู่เบส)บน back bone pCAMBIA2300โดยที่*NPTII* ถูกแทนที่ด้วย*rol*C

2. การเตรียมต้นกล้ามะละกอ และการถ่ายชุดยีน p2313*rol*C เข้าสู่ลำต้นมะละกอด้วยวิธีชักนำราก

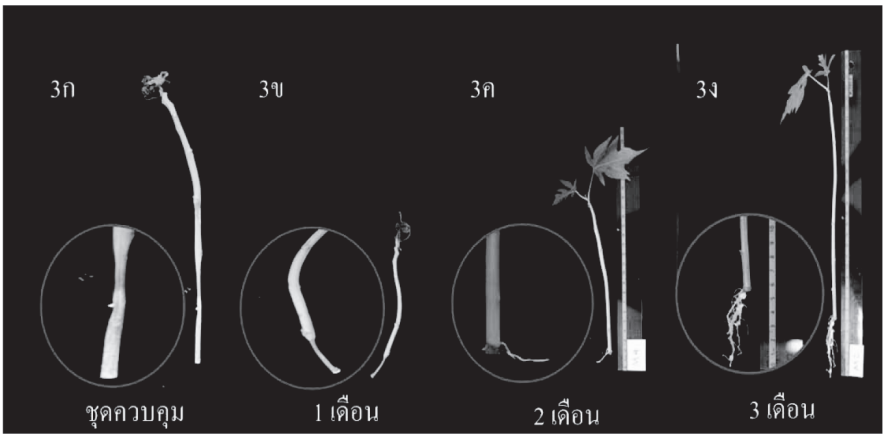
หลังจากนำยอดต้นกล้ามะละกอมาถ่ายยีนด้วยวิธีชักนำรากแบบจุ่มลำต้นมะละกอกับเชื้อแบคทีเรีย พบว่าสามารถชักนำให้ลำต้นมะละกอเกิดรากใหม่ได้ ภายหลังจากการถ่ายยีนนำรากที่เกิดขึ้นใหม่ไปตรวจ สอบด้วยไพรเมอร์จำเพาะกับยีน *rol*Cคือ CP*rol*CXhF และ CP*rol*CXhR พบแถบดีเอ็นเอของยีน *rol*Cขนาดประมาณ1,413 คู่เบส แสดงว่ามีการสอดแทรกของยีน *rol*Cอยู่ในรากมะละกอที่ผ่านการชักนำรากทุกต้นกล้า แต่ไม่พบดีเอ็นเอของยีน *rol*Cที่รากมะละกอปกติ โดยมีดีเอ็นเอของพลาสมิด p2313*rol*C เป็น positive control (ภาพที่ 2) นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบชุดยีน inverted-CP ด้วยไพรเมอร์ SC501 และ SC104และพบแถบดีเอ็นเอที่ขนาด ประมาณ 500 คู่เบส ของยีน CP (ไม่แสดงผล)เป็นการยืนยันว่าชุดยีนทั้งสองชุดถ่ายเข้ารากมะละกอที่เกิดใหม่ได้ โดยที่ส่วนลำต้นและใบยังเป็นเนื้อเยื่อปกติ ที่ไม่มีการถ่ายยีนแต่อย่างใด เนื่องจากยีน *rol*Cเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนในกลุ่มของ cytokininและ auxinซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดรากของพืช (Piatczak*et al*., 2006) และพบว่าไม่มีมีการรายงานการถ่ายยีนด้วยวิธีชักนำรากแบบจุ่มลำต้นมะละกอกับเชื้อพาหะมาก่อน แต่สามารถชักนำให้ลำต้นมะละกอเกิดรากใหม่ได้เพราะกลไกการถ่ายยีนโดยอาศัยเชื้อพาหะ *Agrobacteruimtumefaciens* จะเกิดขึ้นได้เมื่อพืชเกิดบาดแผล ในสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการดำรงชีพของเชื้อพาหะด้วย และจะมีประสิทธิภาพในพืชใบเลี้ยงคู่มากกว่าพืชใบเลี้ยงเดี่ยว(Ayres and Park, 1994)

3. ผลของอายุของต้นกล้ามะละกอที่เหมาะสมต่อการถ่ายยีนด้วยวิธีชักนำราก

การถ่ายยีนเข้าสู่ลำต้นมะละกอที่ช่วงอายุ 1 2 และ 3 เดือนด้วยวิธีชักนำราก โดยพบว่าที่ช่วงอายุยอดต้นกล้ามะละกอที่ 3 เดือนสามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ดีกว่าช่วงอายุยอดต้นกล้ามะละกอที่ 1 และ 2 เดือน โดยพบยอดต้นกล้าที่มีรากใหม่จำนวน 16, 14 และ 0ต้น จากยอดต้นกล้าอายุ 3,2 และ 1 เดือนตามลำดับคิดเป็น 5.33, 4.67 และ 0 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากชุดการทดลองควบคุมทั้ง 3 ช่วงอายุที่ไม่เกิดรากใหม่เลย (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 2 : การตรวจสอบยีน *rol*Cขนาดประมาณ 1,413 คู่เบส ด้วยเทคนิค PCR ในรากมะละกอที่ได้จากการชักนำให้เกิดใหม่ภายหลังการถ่ายยีนด้วย*Agrobacterium tumafaciens*AGL-1; ช่อง M,GeneRuler1 kb DNA Ladder (Fermentas);ช่อง, 1 ผลิตภัณฑ์ PCR จากพลาสมิด p2313*rol*C (positive control);ช่อง 2, ผลิตภัณฑ์ PCR จากดีเอ็นเอรากมะละกอปกติ; และ ช่อง 3 และ 4, ผลิตภัณฑ์ PCR จากดีเอ็นเอรากมะละกอที่ได้รับการถ่ายยีน

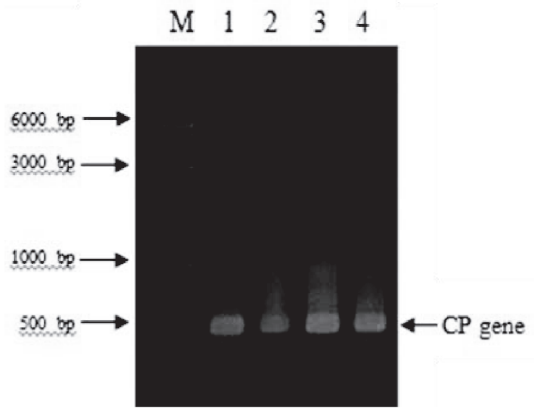


ภาพที่ 3 : ต้นกล้ามะละกอที่ทำการถ่ายยีนด้วยวิธีชักนำรากมะละกอ; (3ก), ยอดต้นกล้ามะละกอที่จุ่มกับน้ำ(3ข), (3ค), และ (3ง) ยอดต้นกล้ามะละกอที่เกิดรากจากการถ่ายยีนด้วยวิธีจุ่มยอดต้นกล้ามะละกอที่อายุ1, 2 และ 3 เดือน ตามลำดับกับเชื้อแบคทีเรีย

โดยพบว่าปัจจัยการเกิดรากใหม่ของกิ่งปักชำจะขึ้นอยู่กับอายุ และชนิดของพืชด้วย ซึ่งอายุยอดต้นกล้าที่ประมาณ 3 เดือนหลังจากการเพาะเมล็ดมีการสะสมสารอาหารที่มากกว่า ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องในการพัฒนาเป็นรากต้นกล้าได้ดีสมบูรณ์ตามไปด้วย(Oda *et al*., 1993) อีกทั้งมีลักษณะเป็นไม้แบบกึ่งอ่อนกึ่งแก่ ช่วยเพิ่มความทนทานต่อสภาพอากาศได้ดีกว่ากิ่งอ่อน ซึ่งสัมพันธ์กับลักษณะของเนื้อไม้ เพราะการเลือกชนิดของเนื้อไม้เพื่อใช้ในการปักชำจะแตกต่างกันตามชนิดของพืช(Faruchi *et al*., 1997; Hartmann *et al*., 1997)

4. การทดสอบต้นพันธุ์มะละกอทนทานโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอภายหลังการถ่ายยีน

ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงต้นมะละกอที่ได้จากการถ่ายยีนในแต่ละช่วงอายุ (2 และ 3 เดือน) มาปลูกถ่ายเชื้อ PRSV ตามวิธีการข้างต้น ต้นกล้ามะละกอที่ผ่านการถ่ายยีนเริ่มแรกจะแสดงอาการของโรค PRSV กับใบมะละกอที่อยู่เหนือจากใบที่ปลูกถ่ายเชื้อ 1 ใบ โดยแสดงอาการภายหลังจากการปลูกถ่ายเชื้อครั้งที่ 2 ประมาณ 7 - 10วัน จากนั้นระดับอาการของโรคจะลดลงเรื่อย ๆ จนพบว่าใบใหม่ ถัดขึ้นมาประมาณ 5–7 ใบจากใบที่ปลูกถ่ายเชื้อ ต้นมะละกอจะมีใบใหม่ที่ไม่แสดงอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนเลย ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในส่วนของอายุต้นกล้าก่อนการถ่ายยีน แต่ภายหลังการตรวจสอบด้วยเทคนิค reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) ยังคงพบเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอคงอยู่ในต้นมะละกอนั้น การตรวจสอบไวรัส และการตรวจสอบหายีน inverted-repeat CP ใช้ไพรเมอร์คู่เดียวกันคือ SC501 และ SC104 นั้นยังคงใช้ตรวจสอบได้และไม่ให้ผลบวกเป็นเท็จเนื่องจากในส่วนของใบและลำต้นนั้นเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่ได้รับการถ่ายยีนจึงไม่ให้ผลบวกเป็นเท็จเมื่อตรวจสอบหาเชื้อไวรัส PRSV ด้วยเทคนิค RT-PCR(ภาพที่ 4) ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่ยังคงแสดงอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนตลอดการทดลอง(ภาพที่ 5) ซึ่งอาจเกิดจากกลไก RNAi silencing ของยีน inverted-repeat CP ที่ส่งสัญญาณป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อ PRSV ทำให้พืชทนทานต่อโรคได้ เพราะ RNA silencing ในพืชสามารถแพร่กระจายจากเซลล์พืชที่เกิด silenced ไปสู่เซลล์ข้างเคียงได้ โดยสามารถแพร่กระจายไปได้ไกลในแต่ละส่วนของพืช ซึ่งเกิดจาก small interference RNA (21-22nt) ผ่านทาง plasmodesmataหรือ phloem ได้ (Hamilton *et al*., 2002; Himber *et al*., 2003; Palauqui *et al*., 1997; Voinnet and Baulcombe, 1997; Winston *et al*., 2002)



ภาพที่ 4 : การตรวจสอบเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอด้วยเทคนิค RT- PCR :โดยตรวจพบเชื้อใบด่างจุดวงแหวนในต้นมะละกอจากยีน CP ขนาด 500คู่เบสทั้งหมด (ช่องที่ 2, 3, 4) โดยใช้พลาสมิดp2313*rol*C (ช่องที่ 1) ต้นที่ได้รับการถ่ายยีนในรากสามารถทนทานต่อโรคหลังจาก recovery

ภาพที่ 5 : การทดสอบความต้านทานต้นมะละกอที่ชักนำรากต่อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอภายหลังจากการถ่ายยีนด้วยวิธีชักนำราก; ก: ต้นควบคุมการทดลอง , (1ก) ใบที่ปลูกถ่ายเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ , (2ก) ใบแสดงอาการของเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ ข : ต้นมะละกอที่ชักนำให้เกิดรากจากเชื้อ *Agrobatceriumtumefaciens*AGL-1 ที่มีพลาสมิด p2313*rol*C, (1ข) ใบที่ปลูกถ่ายเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ, (2ข) ใบมะละกอที่แสดงอาการปกติ ภายหลังการปลูกถ่ายเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

สรุป

ดำเนินการจัดทำพลาสมิดที่มีชุดยีน2 ชุด คือ *rol*C สามารถชักนำให้ยอดต้นกล้ามะละกอเกิดรากใหม่ได้ ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่เกิดรากใหม่เลย เมื่อนำรากที่เกิดใหม่ไปตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR พบว่า มีดีเอ็นเอของยีน *rol*Cทุกต้น ซึ่งแตกต่างจากรากมะละกอปกติซึ่งไม่พบยีน*rol*Cเลย การศึกษาปัจจัยในเรื่องอายุของยอดต้นกล้ามะละกอที่สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ พบว่าอายุที่ 3 เดือนภายหลังจากการเพาะเมล็ด สามารถชักนำให้เกิดรากใหม่ได้ดีกว่าอายุยอดต้นกล้าที่อายุ1 และ 2 เดือน ภายหลังการถ่ายยีน ด้วยวิธีชักนำรากในสภาพโรงเรือน โดยสามารถชักนำยอดต้นกล้ามะละกอให้มีรากใหม่จำนวนมากที่สุด คือ 16 ต้น โดยคิดเป็น 5.33 เปอร์เซ็นต์ของยอดต้นกล้าที่ใช้ในการทดลองทั้งหมด300 ต้น การทดสอบความทนทานต่อเชื้อใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ ภายหลังจากการถ่ายยีนด้วยวิธีชักนำราก พบว่า สามารถชักนำให้มะละกอไม่แสดงอาการของโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอ

และทนทานต่อโรคใบด่างจุดวงแหวนมะละกอได้ทุกต้นที่ผ่านการถ่ายยีน แต่ยังคงตรวจพบเชื้อไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอภายในต้นมะละกอดังกล่าว ซึ่งแตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการถ่ายยีน ยังคงแสดงอาการของโรค จากผลที่ได้นี้ โดยนำให้เกิดรากใหม่โดยชุดยีน *rol*C และอีกชุดคือ inverted-repeatCP ที่คาดว่ามีการชักนำให้เกิด gene silencing ในบริเวณรากได้โดยคาดหวังว่าทำให้กล้ามะละกอที่ชักนำขึ้นใหม่มีความสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัสใบด่างจุดวงแหวนมะละกอซึ่งต้องมีการทดสอบอีกว่าการชักนำความต้านทานในต้นมะละกอที่อายุมากขึ้น ที่ให้ผลผลิตแล้วนั้นยังคงมีความสามารถต้านทานต่อการเข้าทำลายของไวรัสได้อีกหรือไม่

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มีส่วนในการสนับสนุนทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติประจำปีงบประมาณ 2552 ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ทำให้การทำงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Ayres, N. M., and D. Park. 1994. Genetic transformation of rice. Critical Reviews in Plant Sciences 13(3): 219-239.

Chowpongpang, S. 2002. Development of Genetically Engineered Resistance to *Papaya Ringspot Potyvirus* (PRSV) in Thailand. Doctoral Thesis. Queensland University of Technology, Brisbane, Australia.

Faruchi, Y., A. A. Ackerman, S. Gilad, J. Ben-Jaacov, and J. Riov. 1997. Improved methods for rooting cutting of *Protea obtusifolia*. Acta Horticulturae 453: 153-155.

Hamilton, A., O. Voinnet, L. Chappell, and D. Baulcombe. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. European Molecular Biology Organization 21: 4671-4679.

Hartmann, H. T., D. E. Kester, F. T. J. Davies, and R. L. Geneve (1997). "Plant propagation principles and practices." 6th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs.

Himber, C., P. Dunoyer, G. Moissiard, C. Ritzenthaler, and O. Voinnet. 2003. Transitivity-dependent and-independent cell-to-cell movement of RNA silencing. European Molecular Biology Organization 22: 4523-4533.

Ludlow, J. E., A. Mouradov, and C. G. Spangenberg. 2009. Post-transcriptional gene silencing as an efficient tool for engineering resistance to *White clover mosaic virus* in white clover (*Trifolium repens*). Plant Physiology 166: 1557–1567.

Oda, M., K. Tsuji, and H. Sasaki. 1993. Effect of hypocotyl morphology on survival rate and growth of cucumber seedling grafted on *Cucurbita spp*. Japan Agricultural Research Quarterly 26: 259-263.

Palauqui, J. C., T. Elmayan, J. M. Pollien, and H. Vaucheret. 1997. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-tanscriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. European Molecular Biology Organization 16: 4738-4745.

Peña, L., H. Ebinuma, K. Sugita, S. Endo, E. Matsunaga, and K. Yamada (2004). Elimination of Marker Genes From Transgenic Plants Using MAT Vector Systems. *In* "Transgenic Plants: Methods and Protocols", Vol. 286, pp. 237-253. Humana Press.

Piatczak, E., A. Krolicka, and H. Wysokinska. 2006. Genetic transformation of *Centaurium erythraea* Rafn. by *Agrobacterium rhizogenes* and the production of secoiridowids. Plant Cell Reports 25: 1308-1315.

Sambrook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual." Cold Spring Harbor Laboratory New York.

Tournier, B., M. Tabler, and K. Kalantidis. 2006. Phloem flow strongly influences the systemic spread of silencing in GFP Nicotiana benthamiana plants. Plant Journal 47(3): 383-394.

Voinnet, O., and D. C. Baulcombe. 1997. Systermic signaling in gene silencing. Nature 389: 553.

Warin, N., S. Chowpongpang, A. Boonchot, K. Romyanont, R. Rodaree, W. Kositratana, and S. Attathom (2003). New papaya variety resistant to *Papaya ringspot virus*. ใน " The 41st Annual academic meeting ", pp. 539-546, KasetsartUnversity, Bangkok.(inThai)

Wasee, S. (1999). Papaya pp. 45, KamphaengSaen. (inThai)

Winston, W. M., C. Molodowitch, and C. P. Hunter. 2002. Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. Science 295: 2456-2459.